

平成 22 年 9 月 修了 博士学位論文

青紫色素 ヴィオラセインのヒト白血病細胞に
対する細胞毒性

Cytotoxicity of the purple pigment violacein
against human leukemia cells

高知工科大学 大学院 工学研究科 基盤工学専攻

学籍番号 111612

細川 覚司

Kakushi HOSOKAWA

目次

英文要旨	4
概要	7
緒言	10
第一章 ヴィオラセインによる白血病細胞のアポトーシス	
前書き	18
材料と方法	19
結果・考察	25
第二章 ヴィオラセインによるアポトーシスの誘導経路	
前書き	33
材料と方法	36
結果・考察	39

第三章 ヴィオラセインによるプロテインキナーゼの阻害

前書き	43
材料と方法	46
結果・考察	48
総括	53
謝辞	55
参考文献	56
業績	64
付録	66

Abstract

Pseudoalteromonas sp. 520P1, isolated from seawater off the coast of Cape Muroto, produced a purple pigment “violacein”. In this thesis, the cytotoxicity of violacein to leukemia cells, apoptosis induced by violacein and target molecules of violacein were studied.

Violacein is known as a pigment produced by several kinds of bacteria including *Chromobacterium violaceum* isolated from soil and water in tropical and subtropical areas. Recently, violacein was reported to induce the apoptosis of HL60 leukemia cells through the stimulation of tumor necrosis factor receptor (TNFR). In the present study, we showed that violacein induced the cell death of various kinds of leukemia cells (HL60, U937 and K562 cells) through its cytotoxicity. Furthermore, we demonstrated that the cell death is due to apoptosis accompanied by characteristic features of apoptosis, namely chromatin condensation, DNA fragmentation and caspase activation.

It is well known that apoptosis is initiated by either the stimulation of the receptors for tumor necrosis factor (TNF) and

related ligands or the release of cytochrome c from mitochondria upon various stresses. To know the pathway of violacein-induced apoptosis in leukemia cells, we examined the involvement of tumor necrosis factor- α (TNF- α). As a result, the addition of violacein increased soluble TNF- α in HL60 cells, but no increase of soluble TNF- α was found in U937 and K562 cells. It is also known that the stimulation of TNFR promotes the association of TNFR-associated factor 2 (TRAF2) with TNFR. Then we examined the amount of TRAF2 associated with TNFR by the immunoprecipitation with anti-TNFR antibody and the following western blot with anti-TRAF2 antibody. As a result, the amount of TNFR-associated TRAF2 tended to increase slightly in HL60 cell after the treatment with violacein. However, no increase of associated TRAF2 was found in U937 and K562 cells. From these results, apoptosis by violacein is unlikely to be induced by the stimulation of TNFR at least in U937 and K562 cells. Therefore, it seemed that violacein directly interacted with cellular target molecules after it was incorporated into the cells.

Then we examined the relationship of violacein and protein kinase C (PKC), a possible target molecule of violacein, which is

involved in carcinogenesis and cell growth. Addition of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) , an activator of PKC, with violacein to leukemia cells suppressed DNA fragmentation dependent on the concentration of TPA, demonstrating that TPA inhibited violacein-induced apoptosis. The result indicated that the action of violacein was deeply involved in the pathway regulated by PKC. To clarify the further relationship of violacein and PKC, we examined the direct effects of violacein on purified PKC and demonstrated that violacein inhibited PKC enzyme activity with IC₅₀ of 2 μM. These results suggest that the inhibition of PKC by violacein triggered the initiation of apoptosis in leukemia cells.

概要

「室戸海洋深層水」より分離された細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株（520P1 株）が産生する青紫色素ヴィオラセインの白血病細胞に対する細胞毒性の評価、ヴィオラセインが引き起こすアポトーシスの検証、さらにアポトーシスにおけるヴィオラセインの標的分子の探索を行った。

ヴィオラセイン (violacein) は、熱帯・亜熱帯地方の土壌や水域から分離された細菌 *Chromobacterium violaceum* の他、数種の細菌が産生する色素として知られている。近年、ヴィオラセインが白血病細胞 HL60 に対して、腫瘍壊死因子レセプター (TNFR) の活性化によるアポトーシスを誘導することが報告された。本研究では、520P1 株産生ヴィオラセインが、種々の白血病細胞 (HL60 細胞、U937 細胞、K562 細胞) に対して細胞毒性による細胞死を引き起こすことを示した。さらに、この細胞死が、アポトーシスの特徴的な現象であるクロマチン凝縮、DNA の断片化、カスパーゼの活性化を伴うことにより、アポトーシスであることを見出した。アポトーシスの誘導は、腫瘍壊死因子 (TNF: Tumor Necrosis Factor) 等によるレセプターの刺激、または各種ストレスによるミトコンドリアからのシトクロム c の漏出によって始まることが

知られている。そこで、ヴィオラセインによる白血病細胞のアポトーシス誘導経路を知るために、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の関与を調べた。その結果、HL60 細胞ではヴィオラセイン添加による可溶性 TNF- α の増加が見られたが、U937 細胞や K562 細胞では HL60 細胞と異なり、可溶性 TNF- α の増加は認められなかった。また TNFR が刺激されると、TNF レセプター関連因子 2 (TRAF2) と呼ぶタンパク質が TNFR に会合することが知られている。そこで TNFR に会合した TRAF2 を、抗 TNFR 抗体による免疫沈降とそれに続く抗 TRAF2 抗体を用いたウエスタンブロット法により測定した。その結果、ヴィオラセインで処理した HL60 細胞では TNFR に会合した TRAF2 の量が若干増加する傾向があったが、U937 細胞と K562 細胞では TRAF2 の量的増加は全く見られなかった。これらの結果から、少なくとも U937 細胞と K562 細胞では、ヴィオラセインが TNFR の刺激によりアポトーシスを誘導していることを示す証拠は得られなかった。従ってヴィオラセインが細胞内に取り込まれ、標的となる細胞内分子と直接相互作用することが考えられた。そこで標的分子の候補の一つであり、発癌や細胞増殖に関わるプロテインキナーゼ C (PKC) とヴィオラセインの関わりについて検証した。PKC を活性化する 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) をヴィオラセインと共に添加した細胞では、DNA 断片化が TPA 濃度依存的に抑制され、TPA

はヴィオラセインによるアポトーシス誘導を抑制する作用を示した。これはヴィオラセインの作用が PKC による代謝経路と深く関わっていることを示すものである。そこでヴィオラセインと PKC の関係を明らかにするため、精製 PKC に及ぼすヴィオラセインの効果を *in vitro* で評価したところ、ヴィオラセインは PKC の酵素活性に対し阻害作用 ($IC_{50} = 2 \mu\text{M}$) を示した。これらの結果より、ヴィオラセインによる白血病細胞のアポトーシスは、ヴィオラセインによる PKC の阻害が端緒となり引き起こされる可能性が考えられた。

緒言

ヴィオラセイン (Fig. 1) は、ブラジルのアマゾン河流域から分離された細菌 *Chromobacterium violaceum* から単離された青紫色の色素として知られている (Margalith, 1992; Durán and Menck, 2001)。この色素は、熱帯・亜熱帯地方の風土病であるトリパノソーマ症の原虫 *Trypanosoma* に対する抗生作用を持つことから、ブラジルにおいてその治療薬として研究が進められてきた (Leon *et al.*, 2001)。また、ヴィオラセインのグラム陽性細菌に対する抗生作用や糸状菌類、マラリア原虫に対する抗生作用が報告されている。さらに近年、V79 繊維芽細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性の他、HL60 白血病細胞、黒色腫細胞、大腸癌細胞、エールリッヒ腹水癌細胞等の腫瘍細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性が報告された (Melo *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Saraiva *et al.*, 2004; Kodach *et al.*, 2006; de Carvalho *et al.*, 2006; Bromberg *et al.*, 2010; Durán *et al.*, 2007)。そのうちいくつか細胞については、ヴィオラセインのアポトーシス誘導作用が報告された (Melo *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004)。ヴィオラセインの研究は、主に *C. violaceum* が産生するヴィオラセインを用いて進められた。また、*C. violaceum*

の全ゲノム配列はブラジルにおいて解明された (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003)。さらに、ヴィオラセインの生合成に関わる 5 種の合成酵素の遺伝子 (*vioA, B, C, D, E*) 及びその活性が明らかにされ、トリプトファンから始まるヴィオラセインの生合成経路についての詳細な研究が報告されている (Momen and Hoshino, 2000; Sánchez *et al.*, 2006; Balibar and Walsh, 2006; Shinoda *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008; Hirano *et al.*, 2008)。しかし、*C. violaceum* は日和見感染細菌であり、人や動物が感染した場合、重篤な敗血症を起こすことが報告されている (Richard, 1993)。このため、ヴィオラセインの実用的利用に不可欠な大量培養は困難と考えられる。

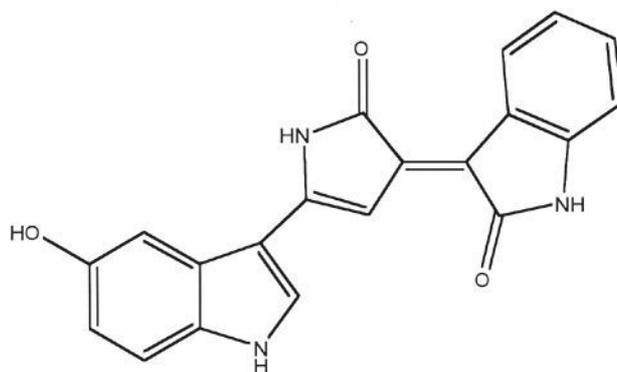


Fig. 1 ヴィオラセインの化学構造

分子量: 343.33、分子式: $C_{20}H_{13}N_3O_3$ 、CAS Number: 548-54-9

C. violaceum の他にも、数種のグラム陰性細菌がヴィオラセインを産生することが報告されており、代表的なものとして

Janthinobacterium lividum (Matz *et al.*, 2004; Pantanella *et al.*, 2007) と *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (McCarthy *et al.*, 1985) が挙げられる。*P. luteoviolacea* から分離したヴィオラセインの物理化学的性質について報告されている (McCarthy *et al.*, 1985; Laatsch and Thomson, 1984)。しかし、これらの細菌から分離された色素の抗腫瘍作用は検証されていない。

アポトーシスは、細胞外からの刺激により起きる細胞死であり、個体の発生や恒常性の維持に欠かすことのできない現象である。さらに、癌や免疫疾患・神経疾患など様々な疾患とも関わりがある。アポトーシスでは、カスパーゼ (cysteiny l aspartic acid-protease:Caspase) というシステインプロテアーゼが重要な役割をしている (Thornberry, 1998; Cho and Choi, 2005)。カスパーゼは様々なタンパク質を分解・活性化することで、細胞死を誘導する実行因子である。ヒトでは 12 種類の遺伝子が見つかっており、その活性中心にはシステイン残基を持っている。カスパーゼは、通常細胞内に前駆体として存在しており、その活性化には、細胞膜上にあるアポトーシスシグナルを伝えるデスレセプターにデスリガンドが結合することによって始まる経路と、ミトコンドリアにアポトーシスシグナルが伝わることで始まる経路の 2 つの経路がある。

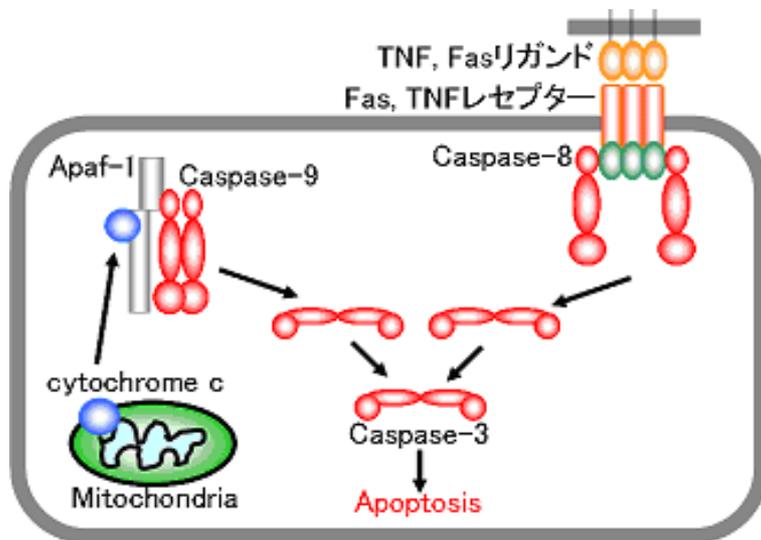


Fig. 2 カスパーゼの活性化機構

細胞内におけるカスパーゼの活性化機構として、ミトコンドリアから流出したシトクロム c がカスパーゼ-9 の活性化因子 Apaf-1 に結合することによるカスパーゼ 9 の活性化経路と、デスリガンドがデスレセプターである Fas や TNF レセプターに結合することによるカスパーゼ-8 の活性化経路がある。これら上流カスパーゼの活性化経路は、下流のカスパーゼ-3 を活性化することで、そのシグナルを増幅する。(田沼靖一編「アポトーシスがわかる」 p51 の図を改変)

レセプター経路におけるカスパーゼの活性化 (Fig. 2) は次のように起こる。即ち、細胞膜上または細胞外に生産されたデスリガンド (TNF- α 、FasL) がデスレセプター (TNFR I、Fas) に結合すると、レセプターの細胞内領域のデスドメインにカスパーゼ-8 がアダプター分子群 (FADD、TRADD、RIP) を介して会合し、複合体 DISC (death inducing signaling complex) が形成される。これにより互いに隣接した前駆体

カスパーゼ-8 は、それ自身が持つ弱い酵素活性を利用して自己消化することで活性化する。ミトコンドリア経路では、アポトーシス誘導刺激がミトコンドリアに膜電位の低下を起し、シトクロム c を漏出させる。これにより、細胞内デスレセプターとして働く Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) にシトクロム c、dATP (または ATP)、前駆体カスパーゼ-9 が結合し複合体 Apoptosome を形成する。その結果、Apoptosome 内で隣接した前駆体カスパーゼ-9 が自己消化することで活性化する。レセプター経路またはミトコンドリア経路のどちらの経路でも、アポトーシス実行酵素であるカスパーゼ-3 がアポトーシス誘導酵素 (カスパーゼ-8、-9) により活性化されることにより、最終的にアポトーシスという細胞死の誘導が決定する。また、アポトーシス細胞の特徴として形態学的変化と生化学的変化がある。形態学的変化では、アポトーシス細胞の細胞表面の微繊毛が消失し、平滑になり、細胞が縮小する。このとき、核内ではクロマチンが凝縮し、核が断片化する。生化学的変化では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や特定タンパク質のリン酸化、カスパーゼファミリーの活性化と特定タンパク質の限定分解が見られる。そして、アポトーシスの特徴的な変化であるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化が起きる (Fig. 3)。

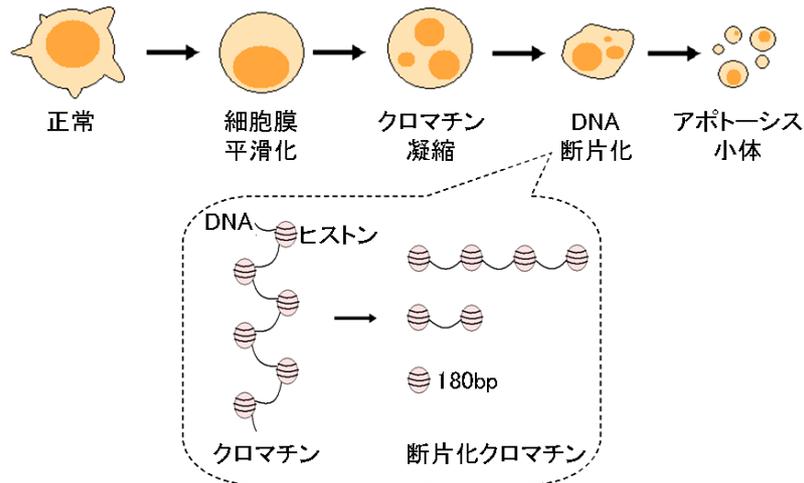


Fig. 3 クロマチン DNA の断片化

アポトーシスが引き起こされた細胞では、まず細胞表面の微絨毛が消失し、平滑になり細胞が縮小する。核内ではクロマチンが凝縮し、核が断片化する。そして細胞自身が断片化してアポトーシス小体が形成され、マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食除去される。

矢田らは、高知県室戸岬沖の「室戸海洋深層水」よりヴィオラセインを産生する細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株を分離した (Yada *et al.*, 2003; Yada *et al.*, 2008)。520P1 株は海洋細菌であるため陸上環境へ拡散する恐れが無い、ヒトの体温である 37°C で生存できないことから人体に感染する恐れは少ない。そこで、520P1 株が産生するヴィオラセインの有用性を実証することを目的とし、白血病細胞に対する細胞毒性の評価、ヴィオラセインが引き起こすアポトーシスの検証、アポトーシスの誘導経路解明を行った。さらに、アポトーシスにおけるヴィオラセインの標的分子の探索を行った。520P1 株産生ヴィオ

ラセインの白血病細胞に対する細胞毒性は、ヒト骨髄球系白血病細胞 HL60、ヒト単核球系白血病細胞 U937、ヒト骨髄球系白血病細胞 K562 を用いて行った。これらの細胞株は様々な研究において広く用いられているため、得られた結果の比較が容易であることから選択した。ヴィオラセインの白血病細胞に対する毒性は、Trypan Blue 色素による生存細胞の計数とミトコンドリア酵素によるテトラゾリウム塩の還元を比色測定することで評価した。さらに、ヴィオラセインによる細胞毒性がアポトーシスによるものなのかを知るために、アポトーシスの指標であるクロマチン DNA の断片化、クロマチンの凝縮、カスパーゼの活性化を測定した。次に、ヴィオラセインによるアポトーシスが、レセプター経路の活性化により誘導されているのかを検証するため、レセプターの活性化を起こすリガンド TNF- α (Tumor necrosis factor- α) の定量やレセプターの活性化によりレセプターに会合するタンパク質 TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) の検出を行った。また、ヴィオラセインが直接標的としている分子の探索では、候補分子としてプロテインキナーゼ C に注目した。プロテインキナーゼ C は発癌や細胞増殖において重要な働きをしている。また、白血病細胞のアポトーシスがプロテインキナーゼ C 活性化により抑制されると報告されている (Masuda *et al.*, 1997)。そこで、プロテインキナーゼ C 活性化剤

12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) の添加によるプロテインキナーゼ C の活性化が、ヴィオラセインによって誘導されるアポトーシスに与える影響を、アガロースゲル電気泳動による DNA 断片化の検出や DNA の蛍光染色による断片 DNA の定量により評価した。さらに、プロテインキナーゼに対するヴィオラセインの直接的作用を酵素活性の測定により調べた。

第一章

ヴィオラセインによる白血病細胞に対する細胞毒性の検証と アポトーシスの評価

ヴィオラセインはヒト白血病細胞 HL60 に対してアポトーシスによる細胞死を誘導することが報告されている (Melo *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004)。同時に、Ferreira *et al.* (2004) は、ヴィオラセインが白血病細胞 U937、K562 や正常ヒトリンパ球、正常ヒト単核球に対して細胞毒性を示さないと報告している。本研究では、ヴィオラセインのヒト白血病細胞への作用を再検証し、ヴィオラセインが HL60 細胞だけでなく、U937 細胞や K562 細胞にも細胞毒性を示すことを明らかにした。細胞毒性は Trypan Blue 染色による生存細胞の計数と、ミトコンドリア酵素によるテトラゾリウム塩の還元により評価した。さらに、ヴィオラセインによる細胞毒性がアポトーシスであるのか検証した。アポトーシスでは特徴的な変化としてクロマチン DNA の断片化、クロマチンの凝縮、カスパーゼの活性化を観察することができる。クロマチン DNA の断片化はアガロースゲル電気泳動、クロマチン凝縮はヘキスト 33342 による DNA の蛍光染色、カスパーゼは蛍光標識阻害剤 FITC-VAD-FMK による蛍光染色と発色標識基質 Ac-DEVD-pNA を用いたカ

スパーゼ活性の比色測定により評価した。

材料と方法

ヴィオラセイン

ヴィオラセインの細菌による生産及び精製は矢田らの方法に従った (Yada *et al.*, 2008)。 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株 (登録番号 NBRC 107703) を PPES-II 液体培地を用い 20°C で培養を行い、色素を生産させた。細菌培養液を遠心分離し、沈殿した菌体に対してエタノールを加え、色素を抽出した。菌体のエタノール懸濁液を遠心分離して菌体を除去し、色素を含む上清のエタノール溶液はロータリーエバポレーターで乾固した。乾固後、エタノールを加えて色素を再溶解し、遠心分離し沈殿物を除いた。再度、乾固を行い、保存した。色素はメタノールに溶解し、Silica カラム (移動相 2-プロパノール)、次に ODS カラム (移動相 40% (vol/vol) アセトニトリル水溶液) で精製を行った。精製色素の純度は HPLC (資生堂 HPLC、カラム: Shiseido Capcell Pak C18, Type MG II 5 μm , size 1.5 mm \times 150 mm、40% (vol/vol) アセトニトリル水溶液、流速 100 $\mu\text{l}/\text{min}$) で確認した。色素濃度は、メタノール中での分子吸光係数を 28,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として算出した (Momen and Hoshino, 2000)。色素はジメチルスルホキシド (DMSO: dimethyl

sulfoxide) に溶解して用いた。

白血病細胞株

ヒト白血病細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたヒト単核球系白血病細胞 U937 (登録番号 JCRB9021)、ヒト骨髓球系白血病細胞 HL60 (登録番号 JCRB0085)、ヒト骨髓球系白血病細胞 K562 (登録番号 JCRB0019) を使用した。

細胞培養

RPMI-1640 液体培地 (R8758)、牛血清 (B9433)、新生子牛血清 (N4762)、アンホテリシン B 溶液 (A2942)、ゲンタマイシン溶液 (G1397)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (P4333) はすべてシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社から購入した。

ヒト白血病細胞 U937、HL60、K562 は、10% 牛血清または 10% 新生子牛血清を含む RPMI-1640 液体培地で培養した。また場合に応じて、抗生物質として、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンホテリシン B、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン、50 U/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを添加した。培養は、37°C、5% CO_2 、加湿環境下で行った。

細胞毒性の評価

細胞毒性の評価は、DMSO に溶解したヴィオラセインを細胞培養液に加えて 24 時間後に行った。培地中の最終 DMSO 濃度は 0.5% を超えないようにした。DMSO 濃度が 1.3% を超えると細胞株によっては分化誘導が起きてしまうためである。Trypan Blue によって染色されない生存細胞を計数するとともに、ミトコンドリア酵素の還元作用によるテトラゾリウム塩化合物 (MTS: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) のホルマザン産物への変換を吸光測定した。いずれの場合もヴィオラセインの 50% 抑制濃度 (IC_{50}) を求めた。以下に詳細な方法を述べる。

白血病細胞 ($3-5 \times 10^5$ 個/ml) 培養液に、ヴィオラセインを最終濃度 0-2 μ M となるように加え、37°C、5% CO_2 の環境下で 24 時間処理を行った。次に Trypan Blue 溶液 (0.4%) と細胞培養液を 1 : 1 で混ぜ、死細胞の染色を行った。改良ノイバウエル型血球計算盤を用い Trypan Blue で染まっていない生存細胞を計数した。また、ヴィオラセイン添加後 24 時間処理した細胞培養液 100 μ l を 96 穴プレートに加え、さらに MTS 溶液 (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) を 20 μ l 添加し、37°C、5% CO_2 の環境下で 1-3 時間

の還元反応を行った。反応後、プレートリーダーで MTS 還元産物であるホルマザン量を吸光度 490 nm で測定した。

クロマチン凝縮の検出

白血病細胞 (3×10^5 個/ml) に最終濃度 2 μ M ヴィオラセインを加え、37°C、5% CO₂ の環境下 3 時間処理し、細胞死を誘導した。細胞培養液 1 ml を遠心分離 (200×g、5 分間) して細胞を集め、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate Buffered Saline) で懸濁、洗浄した。再度、遠心分離 (200×g、5 分間) して細胞を集め、50 μ l PBS に浮遊させた。ヘキスト 33342 溶液 (1 mg/ml) 10 μ l を加え、クロマチンを染色した。スライドガラスに細胞浮遊液を載せ、蛍光顕微鏡を用いて励起波長 350 nm (放射波長 461 nm) で蛍光観察を行った。

断片化 DNA の検出

白血病細胞 (3×10^5 個/ml) に最終濃度 2 μ M の ヴィオラセインを加え、37°C、5% CO₂ の環境下で 3 時間処理を行い、細胞死を誘導した。細胞培養液 10 ml を遠心分離 (200×g、5 分間) して細胞を集め、PBS (氷冷) で懸濁・洗浄した。再度、遠心分離 (200×g、5 分間) で細胞を集め、100 μ l 細胞溶解バッファー (最終濃度 10 mM Tris-HCl pH 7.4、

10 mM EDTA pH 8.0、0.5% Triton X-100)で細胞を溶解した。4℃で15分間静置後、遠心分離(20,000×g、20分間、4℃)を行い、上清液を回収した。上清液にRNase(10 mg/ml) 2 μlを加え、37℃、60分間処理した。その後、Proteinase K(10 mg/ml) 2 μlを加え、37℃、60分間処理した。酵素処理後、5 M 塩化ナトリウム 20 μl とイソプロパノール 120 μl (最終濃度 0.4 M 塩化ナトリウム、50%イソプロパノール)を加え、一晚-20℃に置きDNAの沈殿を行った。次に遠心分離(20,000×g、15分間、4℃)を行い、上清液を除き、沈殿したDNAをTEバッファー 10 μl で溶解した。DNAはアガロースゲル電気泳動(2%アガロースゲル、100 V、90分間)で分離し、アガロースゲル内のDNAをエチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーターを用いDNA断片を検出した。

活性化カスパーゼの蛍光染色

活性化カスパーゼの蛍光染色は、CaspGLOW Fluorescein Caspase Staining Kit (BioVision, K180-100)を用いて行った。白血病細胞(3×10⁵個/ml)に最終濃度2 μM ヴィオラセインを加え37℃、5% CO₂の環境下で3時間処理を行い、細胞死を誘導した。細胞培養液300 μlに蛍光標識(FITC: Fluorescein isothiocyanate)された汎カスパー

ゼ阻害剤 (VAD-FMK) FITC-VAD-FMK (kit) 1 μ l を添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で 60 分間培養した。培養後、細胞を遠心分離 (850×g、5 分間) により集めた。細胞を Wash Buffer (kit) 0.5 ml で懸濁、洗浄し、再度遠心分離 (850×g、5 分間) した。Wash Buffer (kit) 0.1 ml に細胞を懸濁後、スライドガラスに細胞浮遊液を載せ、蛍光染色された活性化カスパーゼを蛍光顕微鏡の励起波長 495 nm (放射波長 520 nm) で観察した。

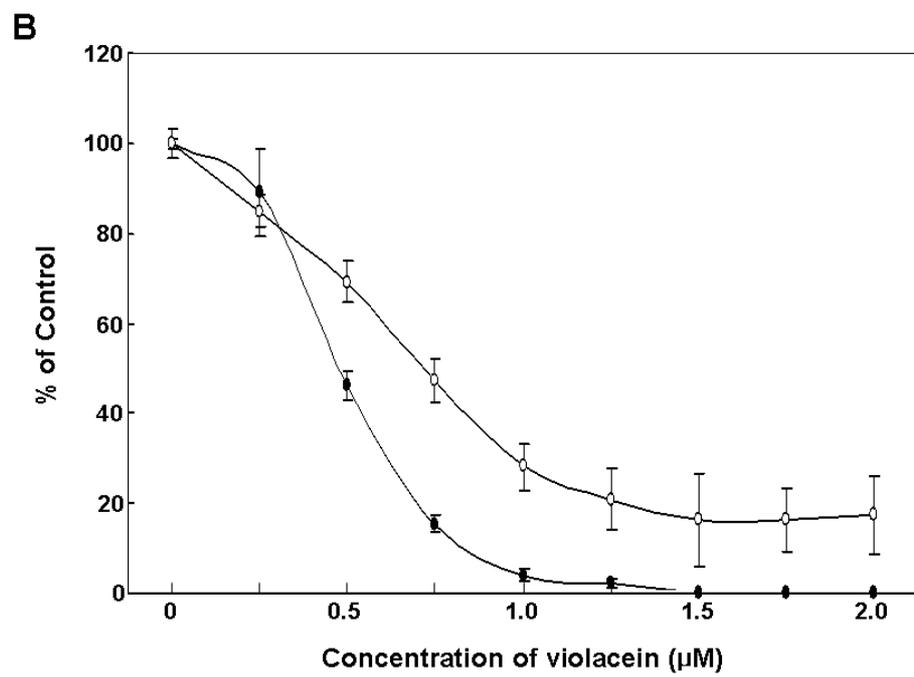
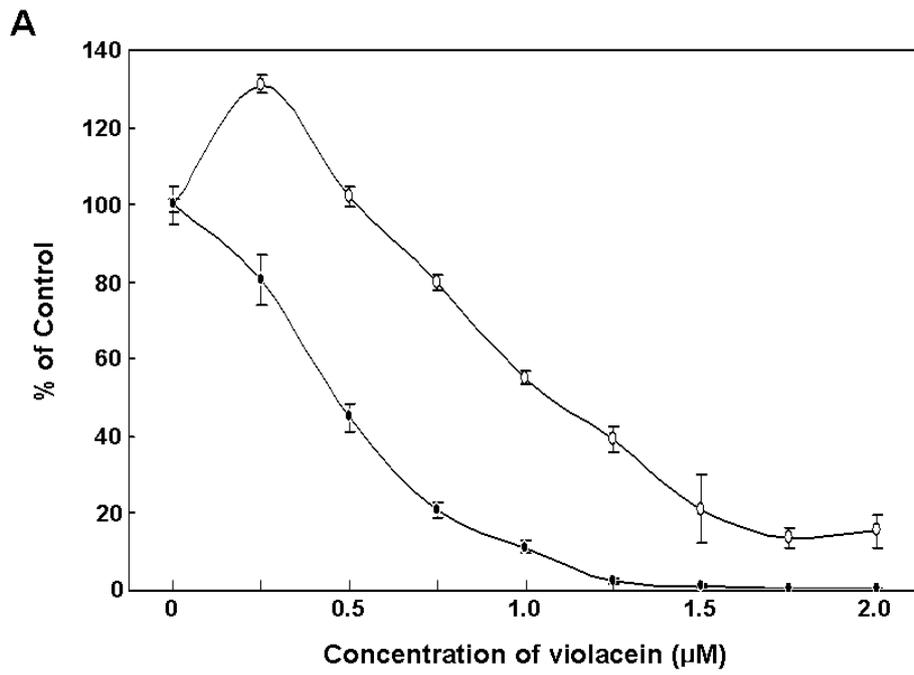
カスパーゼ活性の比色測定

活性化カスパーゼ-3 の酵素活性は、CaspACE Assay System、colorimetric (Promega) を用いて測定した。白血病細胞 (3×10^5 個/ml) に、最終濃度 2 μ M のヴィオラセインを加え、37°C、5% CO₂ の環境下で 3 時間処理した。細胞培養液 10 ml を遠心分離 (450×g、10 分間、4°C) して細胞を集め、PBS (氷冷) で懸濁、洗浄した。再度、細胞を集め Cell Lysis Buffer (kit) 50 μ l で溶解した。4°C、15 分間置いた後、遠心分離 (15,000×g、20 分間、4°C) を行い、上清液を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液と Caspase Assay Buffer (kit) 32 μ l、DMSO 2 μ l、10 mM dithiothreitol (DTT) 10 μ l を混和し、脱イオン水を加え総量 98 μ l となるように調整した。最後に発色物質結合カスパーゼ-3 基質

Ac-DEVD-pNA 2 μ l を加え、総量 100 μ l とした。22°Cで一晩置き、活性化カスパーゼによる基質の切断により遊離したパラニトロアニリン (pNA) をマイクロプレートリーダーで測定することにより定量した。測定には 405 nm の吸光を用いた。

結果・考察

ヴィオラセインの白血病細胞への細胞毒性を調べるため、HL60、U937、K562 細胞にヴィオラセインを添加し、24 時間処理後に Trypan Blue 染色と MTS 還元で生存細胞の評価を行った。その結果、ヴィオラセインは、これら全ての白血病細胞に対して細胞毒性を示した (Fig. 4)。MTS 還元で評価した生存細胞の割合は、Trypan Blue 染色による評価と比較してやや高めであり、特に U937 細胞ではその傾向があった。Trypan Blue 染色に基づく各細胞におけるヴィオラセインの IC_{50} 値は、HL60 細胞で 0.5 μ M、U937 細胞で 0.5 μ M、K562 細胞で 1.6 μ M であった。ヴィオラセインは K562 細胞に対しては、HL60 細胞や U937 細胞の場合と比べてやや低い細胞毒性を示した。



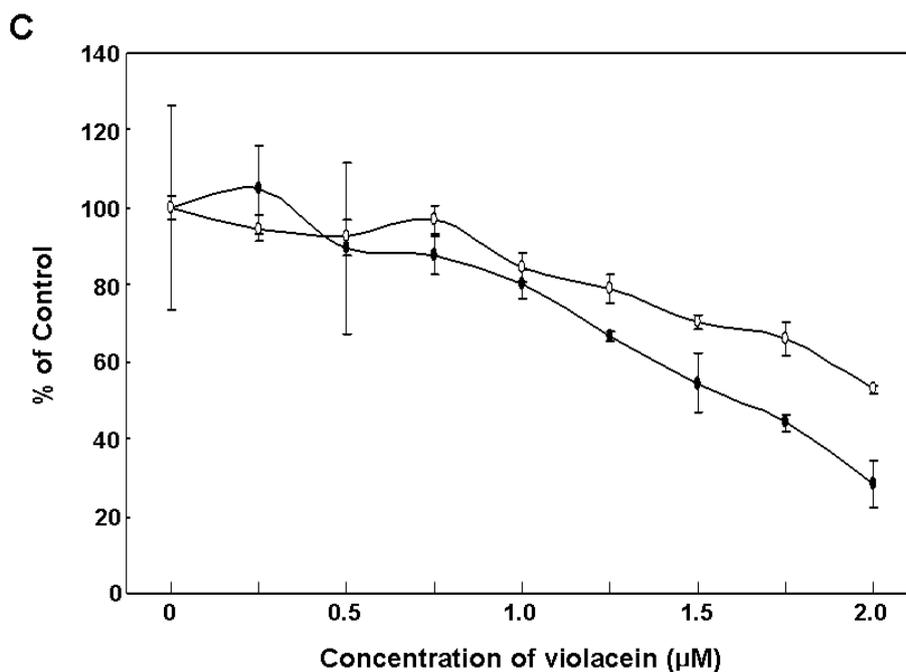


Fig. 4 白血病細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性
 白血病細胞を各濃度のヴィオラセイン存在下で 24 時間処理し、生存細胞率を Trypan Blue 染色 (●) 及び MTS 還元 (○) により評価した。0 µM はヴィオラセインの溶媒である DMSO のみを添加した。(A) U937 細胞、(B) HL60 細胞、(C) K562 細胞

しかし、Ferreira *et al.* (2004) は、ヴィオラセイン (2 µM) は、白血病細胞 HL60、U937、K562 のうち HL60 細胞に対してのみ細胞毒性を示すと報告しており、この実験結果とは異なる。そこで、HL60 細胞と同様に低濃度のヴィオラセインで細胞毒性が見られた U937 細胞の細胞死がアポトーシスによるものであるのかどうかを知るため、クロマチン凝縮、DNA 断片化、カスパーゼ活性を調べた。その結果、ヴィオラセイン処理を 3 時間行った U937 細胞をヘキスト 33342 で蛍光染色すると、細胞内に大小球状の塊として凝縮したクロマチンを観察できた

(Fig. 5A)。HL60 細胞でも同様のクロマチン凝縮が観察できた (Fig. 5B)。

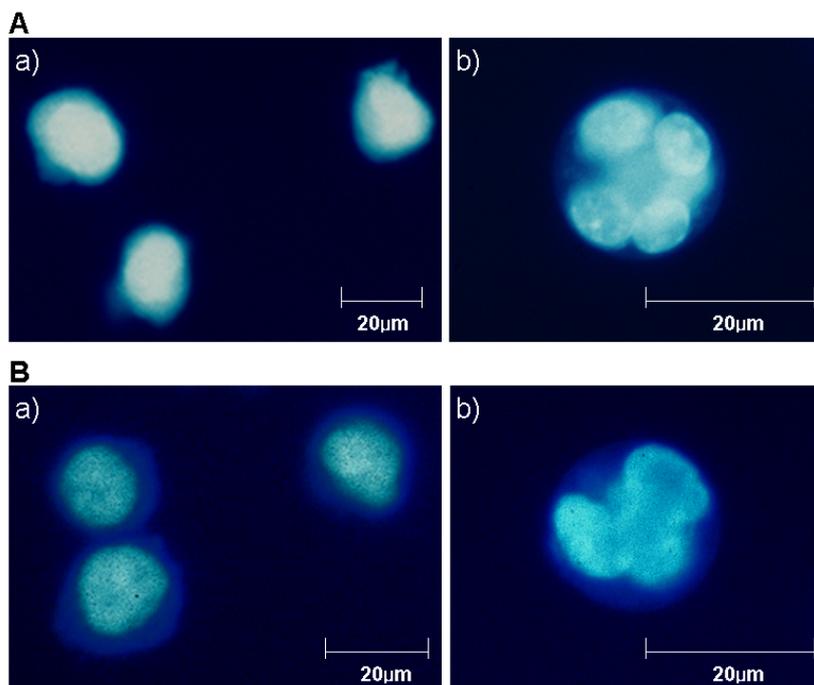


Fig. 5 ヴィオラセインによる白血病細胞のクロマチン凝縮
U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) を 2 μ M ヴィオラセイン
で 3 時間の処理し、ヘキスト 33342 でクロマチンを蛍光
染色した。a) ヴィオラセイン処理なし (DMSO のみ添加)、
b) ヴィオラセイン処理あり

次にヴィオラセイン処理した細胞から DNA を抽出し、クロマチン DNA の断片化をアガロースゲル電気泳動で確認した。Fig. 6 に見られるように、クロマチン DNA がヌクレオソーム単位に断片化した約 180 bp 単位の DNA バンドを観察することができた。

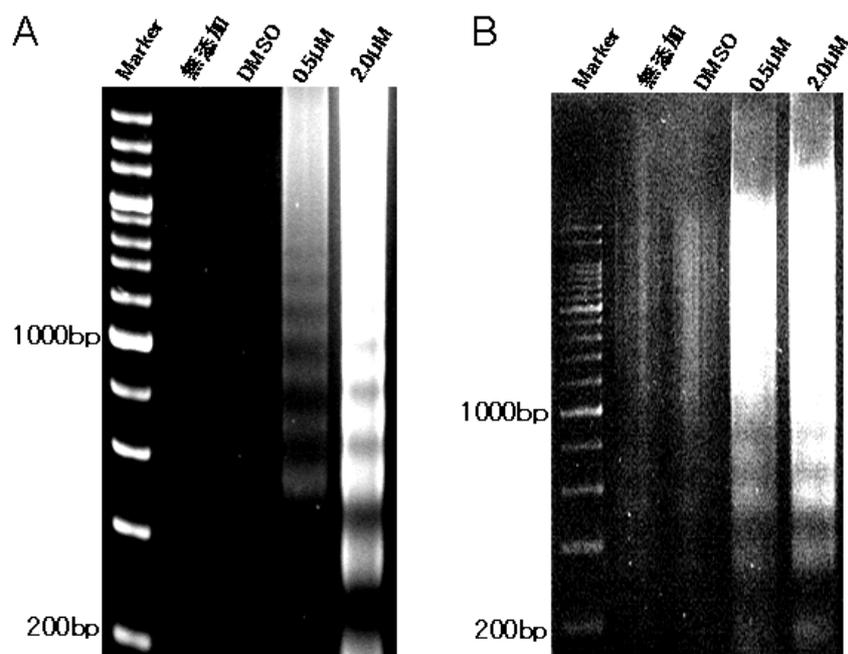


Fig. 6 ヴィオラセインによる白血病細胞の DNA 断片化
 U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) を 0.5 μM と 2.0 μM ヴィオラセインで 3 時間処理した。DNA 抽出後、2% アガロースゲル電気泳動で DNA の断片化を検出した。マーカーは 200 bp DNA Ladder Marker を用いた。

以上のようにアポトーシスの指標であるクロマチン凝縮と DNA 断片化が確認されたので、次にカスパーゼの活性化が起きているかどうかを確かめた。カスパーゼ活性は、蛍光標識された活性化カスパーゼ阻害剤 FITC-VAD-FMK を使い、活性化カスパーゼの蛍光染色を行った。その結果、ヴィオラセインで 2-3 時間処理した U937 細胞中に活性化カスパーゼが存在することを示す FITC の緑色蛍光を観察することができた (Fig. 7)。

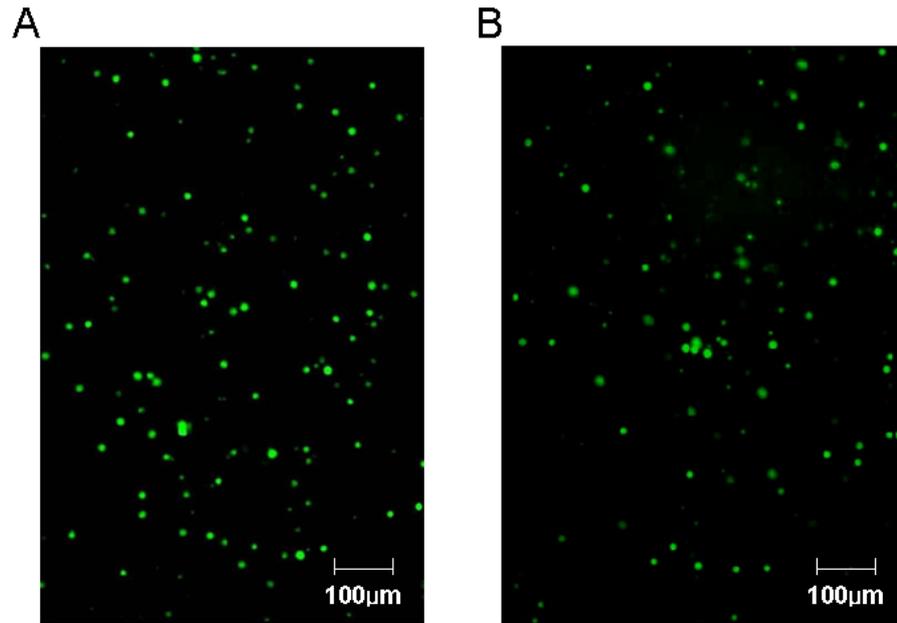


Fig. 7 ヴィオラセインによる白血病細胞のカスパーゼ活性化
U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) を 2 μ M ヴィオラセイン
で 3 時間処理し、蛍光標識カスパーゼ阻害剤
FITC-VAD-FMK により活性化カスパーゼを蛍光染色した。

さらにカスパーゼ-3 活性を直接測定し、活性化が起きているかどうかを確認した。カスパーゼ基質 Ac-DEVD-pNA を用いて酵素活性の比色測定を行ったところ、ヴィオラセイン処理した U937 細胞では、ヴィオラセイン処理していない細胞に比べて、カスパーゼの活性が約 3 倍増加していた (Fig. 8)。

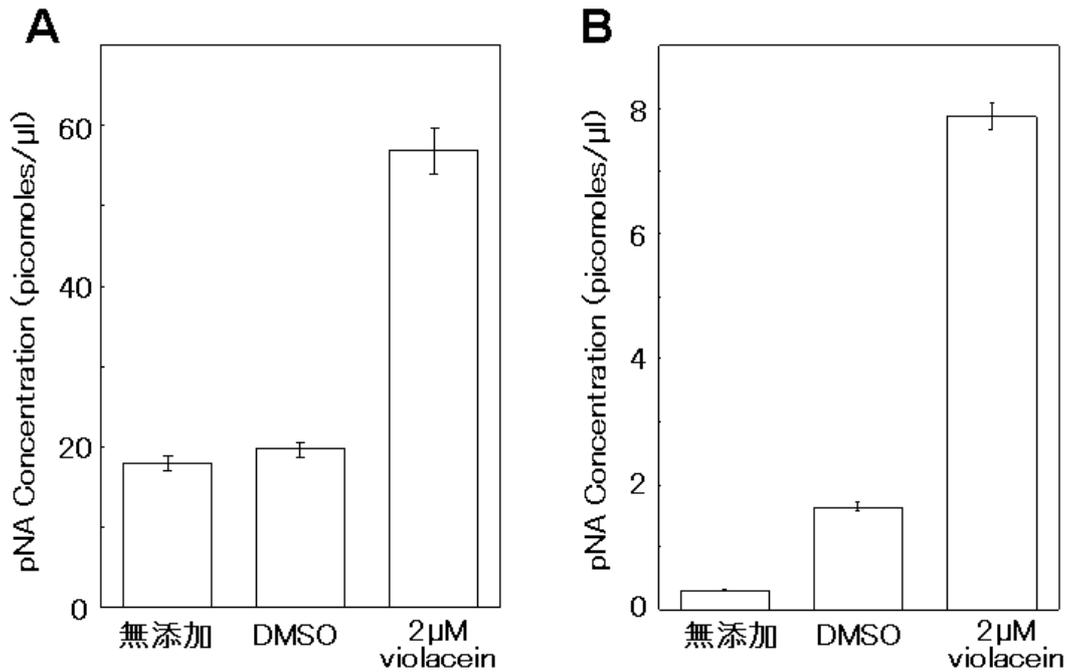


Fig. 8 ヴィオラセインによる白血病細胞のカスパーゼ-3 活性化
 U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) をヴィオラセインで 3 時間処理し、細胞溶解後にカスパーゼ-3 基質 Ac-DEVD-pNA を加えた。活性化カスパーゼ-3 により遊離したパラニトロアニリン (pNA) 量を吸光測定により定量した。

U937 細胞、HL60 細胞、K562 細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性を評価した結果、K562 細胞に対しては U937 細胞、HL60 細胞の場合ほど強い毒性を示さなかったが、全ての細胞において生存細胞の減少が見られた。これまでヴィオラセインは HL60 細胞にのみ細胞毒性を示すとされてきたが、本研究においてヴィオラセインが U937 細胞と K562 細胞に対しても細胞毒性を示すことを明らかにできた。特に U937 細胞は HL60 細胞と同等の細胞毒性感受性を示した。さらに、この U937 細胞に対する毒性が、アポトーシスの誘導によるものであるのかを検証

し、アポトーシスの特徴であるクロマチン凝縮、DNA断片化、カスパーゼ活性化が起きていることを確認した。Ferreira *et al.* (2004)は、HL60細胞のアポトーシスはTNFRの活性化によると報告しているが、このU937細胞のアポトーシスの誘導経路は明らかではない。そこで、続く第二章では、ヴィオラセインによるU937細胞のアポトーシスが、HL60細胞のアポトーシスで提唱されているTNFRの活性化と同様の経路で引き起こされているのかを検証した。

第二章

ヴィオラセインによるアポトーシスの誘導経路

第一章で述べたようにヴィオラセインの HL60 および U937 白血病細胞に対する毒性は、アポトーシスの誘導による細胞死であることが明らかになった。そこで、このアポトーシスがどのように誘導されるのか、アポトーシスの誘導経路の解明を試みた。先に Ferreira *et al.* (2004) は、ヴィオラセインが HL60 細胞の TNF- α レセプター (TNFR) シグナル伝達経路を活性化することによってアポトーシスを引き起こすと報告している。その根拠として、HL60 細胞にヴィオラセインを添加すると可溶性 TNF- α が出現すること、TNFR 活性化に伴う TRAF2 の TNFR への会合が見られること、カスパーゼ-8 の活性化が起こることを挙げている。さらに TNF- α に対するモノクローナル抗体であるインフリキシマブ (infliximab) によって、これらのヴィオラセインによる細胞毒性や上記のカスパーゼ 8 の活性化が阻害されると報告している。同時に、ヴィオラセイン (2 μ M) は U937 細胞に対して細胞毒性を示さないと述べている。

本研究では、ヴィオラセインは HL60 細胞だけでなく U937 細胞に対しても細胞毒性を示した。また、U937 細胞の細胞毒性には、クロマチ

ン凝縮や DNA 断片化、カスパーゼ活性化等のアポトーシスの特徴を伴うことも判明した。しかし、ヴィオラセインによる U937 細胞のアポトーシスの誘導機構は明らかとなっていない。そこで第二章では、U937 細胞のアポトーシスが HL60 細胞同様、TNF レセプターが関与することによって誘導されるのかを、HL60 細胞と対比することによって調べた。

レセプターを介するアポトーシスは、リガンドがレセプターに結合することで始まる (Fig. 9A)。リガンドの一つである TNF- α は細胞膜上に産生され、TACE (TNF- α converting enzyme) と呼ばれる膜結合型メタロプロテアーゼにより限定分解され、可溶型に転換される (Fig. 9B)。

そこで、ヴィオラセインを添加することで白血病細胞から産生される TNF- α 量に変化が起きるのか酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) を用い調べた。さらに、TNFR の活性化を知るために、レセプターに TNF- α が結合することによって起こる、レセプターの細胞内領域へのアダプター分子 TRAF2 の結合の検出を行った。即ち TNFR の免疫沈降を行い、それに会合する TRAF2 をウエスタンブロット法により検出をした。

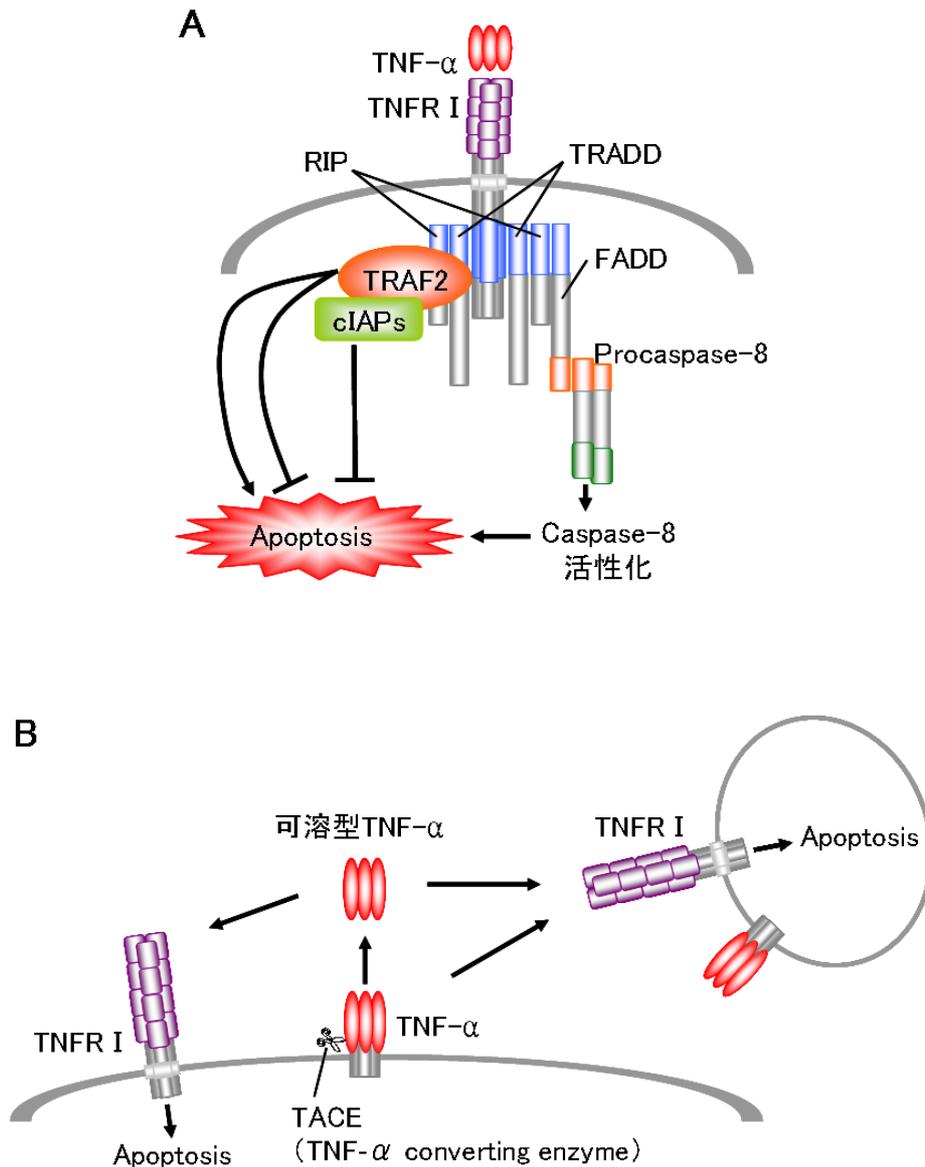


Fig. 9 TNF レセプターの制御モデル

(A) TNF- α が TNF レセプター (TNFR) に結合することでレセプターが活性化する。TRAF2 は TRADD、RIP に結合し、cIAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) が TNFR とそのアダプター分子群から構成される DISC (death inducing complex) へ移行することを誘導し、アポトーシスを抑制する。また、TRAF2 は NF- κ B、JNK (Jun-N-terminal kinase) の活性化によりアポトーシスの抑制または促進を行う。(B) 細胞膜上の TNF- α は TNF- α 転換酵素により可溶型となる。(田沼靖一編「アポトーシスがわかる」 p24、p81 の図を改変)

材料と方法

可溶性 TNF- α の ELISA による検出

可溶性 TNF- α の検出は Human TNF- α ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) を用いた。

U937、HL60、K562 細胞 (1×10^6 個/ml) にそれぞれ最終濃度 2 μ M ヴィオラセインを添加し、37°C、5% CO₂ 濃度の環境下で 130 分間処理し、アポトーシスを誘導した。細胞培養液を遠心分離 (400 \times g、5 分間、4°C) し、培養上清液を試料とした。96 well プレート (kit) に精製抗ヒト TNF- α 抗体 (MAb1) である Capture antibody (kit) を 100 μ l/well 入れ、4°C で一晩置いた。抗体がウェルに結合した後、Wash Buffer (1 \times PBS、0.05% Tween-20) 250 μ l/well で洗浄した。測定試料を 100 μ l/well 入れ、4°C で一晩置き結合反応を行った。Wash Buffer 250 μ l/well で洗浄後、ビオチン結合抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体 (MAb11) である Detection antibody (kit) 100 μ l/well を入れ、室温で 60 分間置いた。洗浄後、ビオチン検出には、HRP (horseradish peroxidase) が結合した Avidin-HRP を使用した。Avidin-HRP (kit) 100 μ l/well を入れ、室温で 30 分間反応を行った。洗浄後、テトラメチルベンジジン (TMB: Tetramethylbenzidine) 溶液である Substrate Solution (kit) 100 μ l/well で呈色し、Stop Solution (1 M H₃PO₄) 50 μ l で反応を停

止した。吸収波長 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、可溶性 TNF- α を定量した。

TNFR I 活性化のウエスタンブロット法による検証

ヴィオラセインによるアポトーシスの誘導経路を明らかにするため、TNFR-TRAF2 の複合体を免疫沈降し、TRAF2 をウエスタンブロット法により検出した。

(1)免疫沈降

U937 細胞 (1×10^6 個/ml) に最終濃度 2 μ M ヴィオラセインを添加し、37°C、5% CO₂ 濃度の環境下で 180 分間処理し、アポトーシスを誘導した。細胞は遠心分離 (400 \times g、5 分間、4°C) で集め、PBS (氷冷) で洗浄後、細胞溶解液 (CellLytic M, Sigma) を 100 μ l/10⁶ 個細胞の割合で加え溶解した。4°C で 10 分置き、遠心分離 (20,000 \times g、10 分間、4°C) し上清液を回収した。免疫沈降には、抗ヒト TNFR I 抗体としてヤギ-ポリクローナル IgG の Anti-human sTNFR I (TNF-BPI) Antibody (R&D Systems, Inc.) を用いた。この抗体を 1 μ l (1 μ g) 添加し、4°C で一晩振盪した。抗体とそれに結合したタンパク質を回収するために、セファロース CL-4B ビーズにプロテイン A が結合した Protein A-Sepharose from *Staphylococcus aureus* (Sigma) を使用した。このビーズを、20 μ l

(bed vol. 5 μ l) 添加し、4°C で 60 分間振盪した。遠心分離 (3,000 \times g、2 分間、4°C) で Protein A-Sepharose を回収し、PBS (氷冷) で洗浄した。

(2) ウェスタンブロット法

洗浄した、Protein A-Sepharose に 2 \times SDS サンプルバッファーを最終濃度 1 倍になるように添加し、95°C、5 分間加熱した。遠心分離 (12,000 \times g、30 秒間) で上清液を回収し、プレキャストゲル (e・パジェル 12.5%、アトー) を用い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (200V、15mA、90 分間) を行った。ゲルと PVDF 転写膜 (Amersham Hybond-P, GE Healthcare) を上下 3 枚ずつの濾紙 (Whatman chromatography paper, 3MM CHR) ではさみ、タンパク質を PVDF 膜に転写 (100V、60 分間) した。その後、1% スキムミルク (Wako) を用いブロッキングを一晩行った。TRAF2 を検出するための一次抗体として、ウサギ-ポリクローナル抗体の TRAF2 (N-19) :sc-877 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を使用した。抗体は 1% (vol/vol) Tween 20-PBS (T-PBS) で 1,000 倍希釈 (200 ng/ml) し、60 分間反応を行い、T-PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。二次抗体として、Anti-Rabbit IgG、Horseradish peroxidase-linked whole antibody (Amersham) を T-PBS で 25,000 倍希釈し、60 分間反応を行い、T-PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。

返した。検出は、化学発光試薬（Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare）を用い、1 分間反応後、暗室にて、X 線フィルム（Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare）に 5 分間露光することによって行った。フィルムの処理は、現像液（レンドール、フジフィルム）に 5 分間、定着液（レンフィックス、フジフィルム）に 5 分間浸して行った。

結果・考察

ヴィオラセインによるアポトーシスが TNFR 活性化により誘導されているのかを確かめるため、レセプターの活性化因子である TNF- α の検出を行った。白血病細胞をヴィオラセインで 3 時間処理し、その培養上清液中の可溶性 TNF- α 量を ELISA により測定した。その結果、HL60 細胞ではヴィオラセインの濃度依存的に可溶性 TNF- α 量の増加がみられた。しかし、U937 細胞、K562 細胞では可溶性 TNF- α の増加は見られなかった（Fig. 10）。

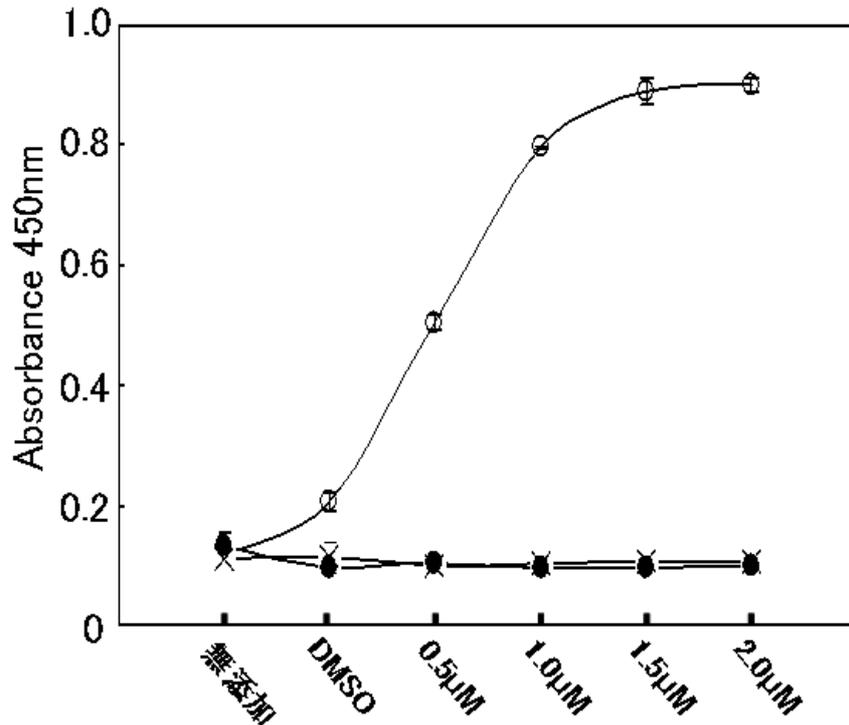


Fig. 10 ヴィオラセインによる可溶性 TNF- α 遊離量の変化

U937 細胞 (●)、HL60 細胞 (○)、K562 細胞 (×) をヴィオラセインで 3 時間処理し、その培養上清液中の可溶性 TNF- α 遊離量の変化を ELISA により測定した。図中の DMSO では、ヴィオラセインの溶媒である DMSO のみを添加した。

しかし、これはアッセイの検出限界であることも考えられたため、活性化した TNFR の細胞内領域に結合するアダプター分子 TRAF2 の検出を行った。白血病細胞をヴィオラセインで 3 時間処理後、細胞を溶解し TNFR を免疫沈降した。そして、TNFR 活性化によりレセプターに会合していると考えられる TRAF2 をウエスタンブロット法により検出した。その結果、全ての白血病細胞で少量の TRAF2 が検出された (Fig. 11)。HL60 細胞ではヴィオラセイン添加により TRAF2 の量が若干増加する傾

向が見られたが、著明なものではなかった。U937 細胞と K562 細胞では
ヴィオラセインによる TRAF2 量の増加は全く見られなかった。

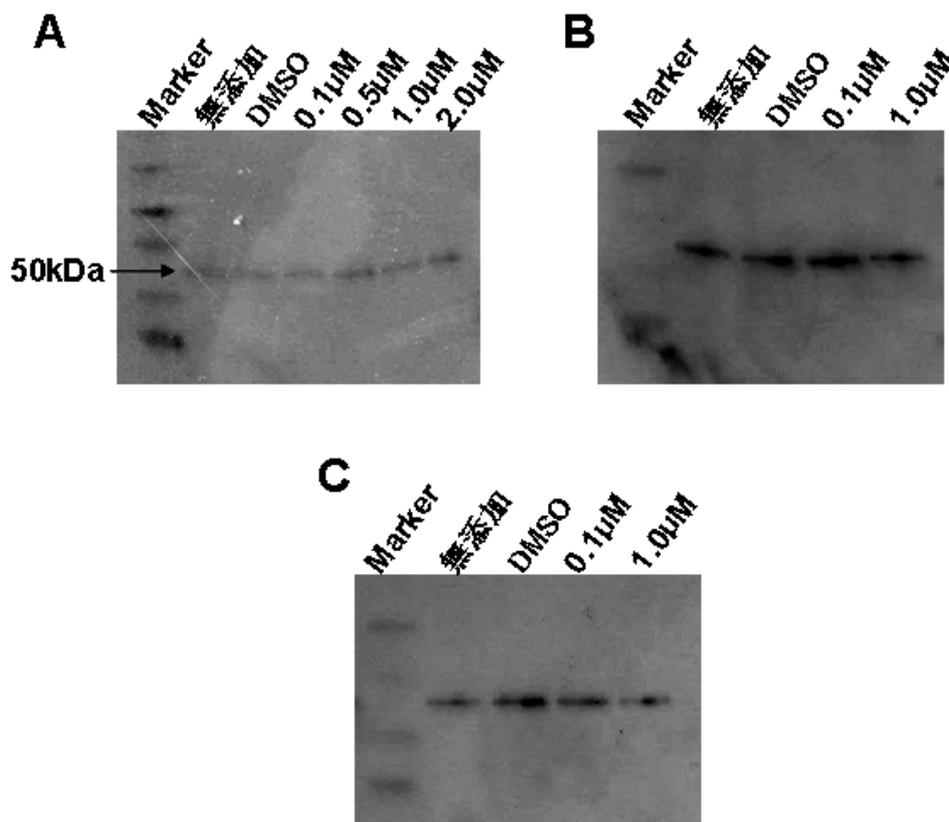


Fig. 11 ヴィオラセインによる TRAF2 への影響

HL60 細胞 (A)、U937 細胞 (B)、K562 細胞 (C) を 0-2.0 μM ヴィオラセインで 3 時間処理後、TNFR-TRAF2 の複合体を TNFR 抗体により免役沈降した。レセプターの活性化を示す TRAF2 は、TRAF2 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

これらの結果から、HL60 細胞には TNF- α が存在し、ヴィオラセイン
添加による可溶性への転換が認められたが、ヴィオラセインによる
TRAF2 の増加は極めて微弱なものであるため、HL60 細胞のアポトーシ
スに TNF- α が関与するとしても主要な誘導因子ではないと考えられた。

また、U937 細胞、K562 細胞では、可溶性 TNF- α が検出できないことから、細胞膜上の TNF- α が作用してアポトーシスを引き起こす可能性が考えられる。しかし、ヴィオラセインによる TRAF2 量の増加が見られないことから、このアポトーシスにおいても HL60 細胞の場合と同様に、TNF- α は主要な誘導因子ではないと考えられた。このことから、ヴィオラセインによるアポトーシスの主要経路はレセプターの活性化ではなく、もう一つの誘導経路であるミトコンドリア経路であることが考えられた。レセプター経由の場合でもアポトーシスに関与するシグナルは最終的にミトコンドリア経路の活性化に行き着く。そのため、ヴィオラセインのアポトーシス誘導作用の解明には、ミトコンドリア経路の上流にあると予想される、レセプター経路以外の作用点を探索する必要があると考えられた。また、細胞をヴィオラセインと共に培養すると、細胞の洗浄後も細胞はヴィオラセインによって着色していることから、ヴィオラセインは細胞内に移行して作用すると推測された。そこで第三章では細胞内におけるヴィオラセインの標的分子の探索を試みた。

第三章

ヴィオラセインのプロテインキナーゼに対する影響

第二章の結果から、ヴィオラセインによる初期のアポトーシスにおいて、レセプターの関与を示す証拠を得ることはできなかった。一方で、ヴィオラセインが細胞内に取り込まれ標的となる細胞内分子と直接相互作用することが考えられた。そこで、標的分子の候補として細胞内の種々の代謝の調節に関わるプロテインキナーゼ、特に発がんプロモーターとしても知られるプロテインキナーゼ C (PKC) に対する作用に注目した。

プロテインキナーゼの一つである PKC は、セリン・スレオニンをリン酸化するタンパク質リン酸化酵素である。その機能は、細胞増殖、遺伝子発現、受容体制御、イオンチャネル・ゲーティング、アポトーシスなどに広く関与している。PKC の機能異常がさまざまな病気、癌などの原因となることから、PKC をはじめとしたプロテインキナーゼを標的とした抗癌剤の研究が行われている。

代表的な PKC 阻害剤として、スタウロスポリン (Staurosporine) がある (Fig. 12)。スタウロスポリンは、化学構造に 2 つのインドール環とカルバゾール骨格からなるインドロカルバゾール骨格をもつ、強

力なプロテinkinase阻害剤であり、Jurkat 細胞に対してアポトーシスを引き起こすことが報告されている (King *et al.*, 2007; Ullal and Pisetsky, 2010)。

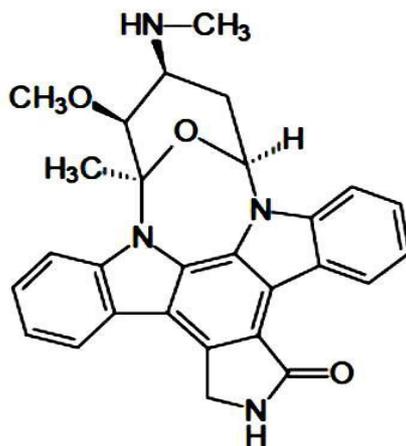


Fig. 12 スタウロスポリンの化学構造
分子量 : 466.5、分子式 : $C_{28}H_{26}N_4O_3$ 、
CAS Number : 62996-74-1

スタウロスポリンの生合成経路はヴィオラセインの生合成経路と一部は共通であり、トリプトファンから始まる (Fig. 13) (Hirano *et al.*, 2008)。両経路ともトリプトファンはインドール-3-ピルビン酸イミン (IPA イミン) へと変換され、次に IPA イミン 2 分子が結合した未同定の中間体 X が生じる。しかし、ヴィオラセイン合成では、合成酵素 VioE によって中間体 X はプロトデオキシヴィオラセイン酸へと変換され、スタウロスポリンとは別の合成経路に入る。

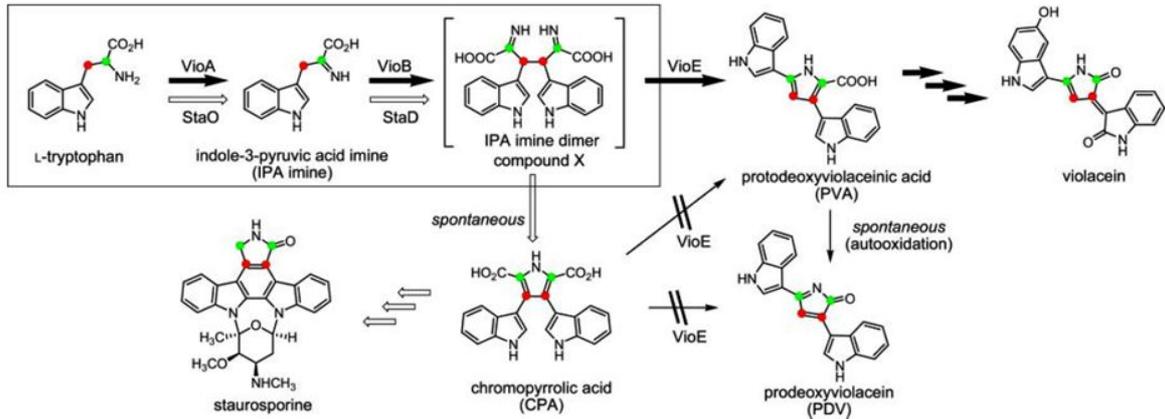


Fig. 13 ヴィオラセインとスタウロスポリンの生合成経路

トリプトファンに、ヴィオラセイン合成酵素 VioA、VioB、VioC、VioD、VioE が作用することでヴィオラセインが合成される。また、トリプトファン 2 分子が結合した中間体 X から生じるクロモピロリン酸 (CPA) にスタウロスポリン合成酵素が働くことで、スタウロスポリンが合成される (Hirano *et al.*, 2008)。

しかし、Fig. 13 で見られるように、ヴィオラセインとスタウロスポリンは、インドール環を 2 個有し、部分的ではあるが化学構造、生合成経路に類似性が見られる。このことから、ヴィオラセインがスタウロスポリンのように PKC を阻害する作用をもつのではないかと考えた。そこで本研究では、ヴィオラセインが直接的に作用する標的分子を明らかにするために、PKC を強力に活性化させる 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) を添加することでヴィオラセインが引き起こす細胞死への影響を検証した。さらに、精製プロテインキナーゼ A (PKA)、精製プロテインキナーゼ C を用いたヴィオラセインによる酵素阻害も検証した。

材料と方法

ホルボールエステルによるヴィオラセイン誘導細胞死への影響

(1) 断片化 DNA の検出

プロテインキナーゼ C 活性化因子として TPA (Sigma, P1585) を用いた。U937、HL60 細胞 (1×10^6 個/ml) 10 ml に対して 1 μ M ヴィオラセイン、10-100 nM TPA を添加し、3 時間処理を行った。ヴィオラセイン処理後、DNA 抽出を行い、アガロースゲル電気泳動により断片化 DNA を検出した。DNA の抽出及び、断片化 DNA の検出は、第一章の断片化 DNA の検出と同様の方法で行った。

(2) 断片化・非断片化 DNA の定量

U937、HL60 細胞 (1×10^6 個/ml) 10 ml に対して 1 μ M ヴィオラセイン及び 10-100 nM TPA を添加し、3 時間処理を行った。細胞培養液を遠心分離 (200 \times g、5 分間) して細胞を集め、100 μ l 細胞溶解バッファ (CellLytic M, Sigma) を加え、細胞を溶解した。4 $^{\circ}$ C で 15 分間静置後、遠心分離 (20,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ C) を行い、断片化 DNA が含まれている上清液を回収した。非断片化 DNA を含む沈殿物は 200 μ l 細胞溶解液を加え超音波破碎を (30W、1 分間 (Sonics Vibra Cell Ultrasonic Proc. VC-130S)) 行い、非断片化 DNA 由来の試料とした。各試料に 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI、1mg/ml)

を 0.4 μ l (最終濃度 2 μ g/ml) 添加し、DNA を DAPI 染色した。染色後、マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (励起光 362nm、放射光波長 454nm) を測定することにより DNA を定量した。

グイオラセインによるプロテインキナーゼの阻害作用

(1) プロテインキナーゼ A

リン酸化反応の測定は Toomik and Ek (1997) の方法に従って行った。

グイオラセイン 5 μ l (DMSO 溶解) を含む酵素反応液 (最終濃度 25 mM Tris-HCl pH 7.5、9.4 mM $MgCl_2$ 、100 μ M kemptide (Sigma, K1127)、0.1 mg/ml 卵白アルブミン、10 unit/ml Protein kinase A catalytic subunit (Sigma, P2645)) に [γ - ^{32}P]ATP (最終濃度 0.19 mM、比放射能 1.0 kBq/nmol に調整 (Perkin-Elmer, NEG502A)) を添加することにより、反応を開始した。酵素反応は最終容量 100 μ l で 30°C、10 分間行い、氷冷した 800 mM リン酸溶液 10 μ l を添加することにより反応を停止した。リン酸化した基質を含む反応溶液を P-81 phosphocellulose paper (Whatman) に染込ませ、氷冷した 75 mM リン酸溶液で洗浄し、液体シンチレーターで放射能を測定した。放射能測定はチェレンコフ光によって実施し、リン酸化量を求めた。

(2) プロテインキナーゼ C

リン酸化反応の測定は Sigma-Aldrich, Inc. が指示する方法を修正して行った。ヴィオラセイン 5 μ l (DMSO 溶解) を含む酵素反応液 (最終濃度 20 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM $MgCl_2$ 、20 μ M [Ser²⁵]-PKC fragment (19-31) (フナコシ, P-111)、21 ng/ml Protein kinase C catalytic subunit (Sigma, P1609)) に [γ -³²P]ATP (最終濃度 0.1 mM、比放射能 2.8 kBq/nmol に調整 (Perkin-Elmer, NEG502A)) を添加することにより、反応を開始した。酵素反応は最終容量 100 μ l で 30°C、20 分間行い、氷冷した 800 mM リン酸溶液 10 μ l を添加することにより反応を停止した。リン酸化量の測定は、上述のプロテインキナーゼ A と同じ方法で行った。

結果・考察

ヴィオラセインによる細胞のアポトーシスに PKC が関与しているのか知るために、TPA による細胞内 PKC の活性化を行った。ヴィオラセインによる細胞死の誘導に対する TPA の影響は、アポトーシスに伴うクロマチン DNA の断片化をアガロースゲル電気泳動で検証することにより評価した。1 μ M ヴィオラセインと 10-100 nM TPA を添加し、3 時間処理した U937 細胞及び HL60 細胞では、TPA 濃度依存的に DNA 断片化が減少しており、TPA はヴィオラセインによるアポトーシスを抑制すると

考えられた (Fig. 14)。

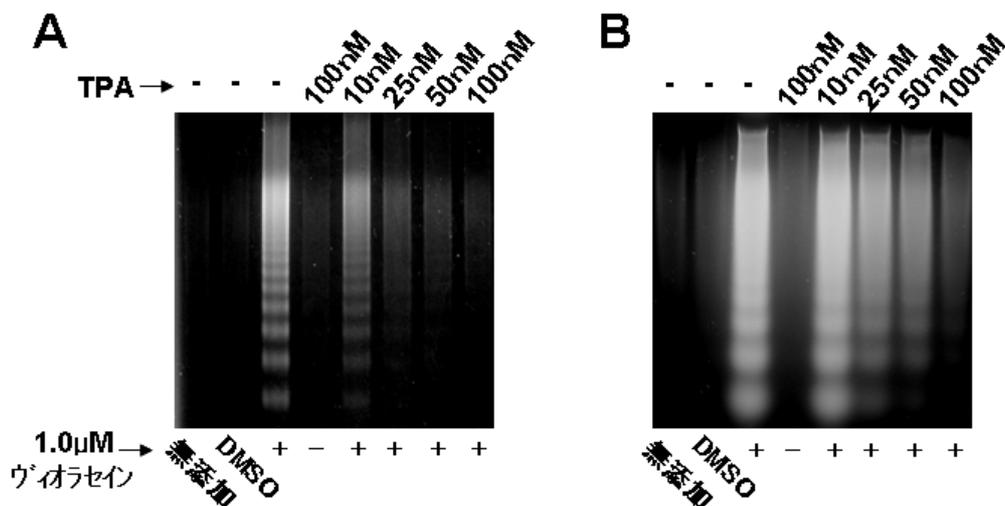


Fig. 14 ヴィオラセインによる DNA 断片化に対する TPA の影響
U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) を 1 μ M ヴィオラセインと 10-100 nM TPA 存在下で 3 時間処理した。DNA の抽出後、アガロースゲル電気泳動で断片化 DNA を分離した。

しかし、K562 細胞では、HL60、U937 細胞と同様の条件では、ヴィオラセインによる DNA の断片化は見られなかった(データは示さず)。これは HL60 及び U937 細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性の IC_{50} が 0.5 μ M であるのに対し、K562 細胞に対する IC_{50} が 1.5 μ M と、ヴィオラセインに対する感受性が低いためと考えられた。

また、DAPI を用いた DNA の蛍光染色による DNA 断片化量の定量では、アガロースゲル電気泳動の結果と同様に、TPA 濃度依存的に U937 細胞及び HL60 細胞の DNA の断片化量を示す DAPI の蛍光量が減少していた (Fig. 15)。

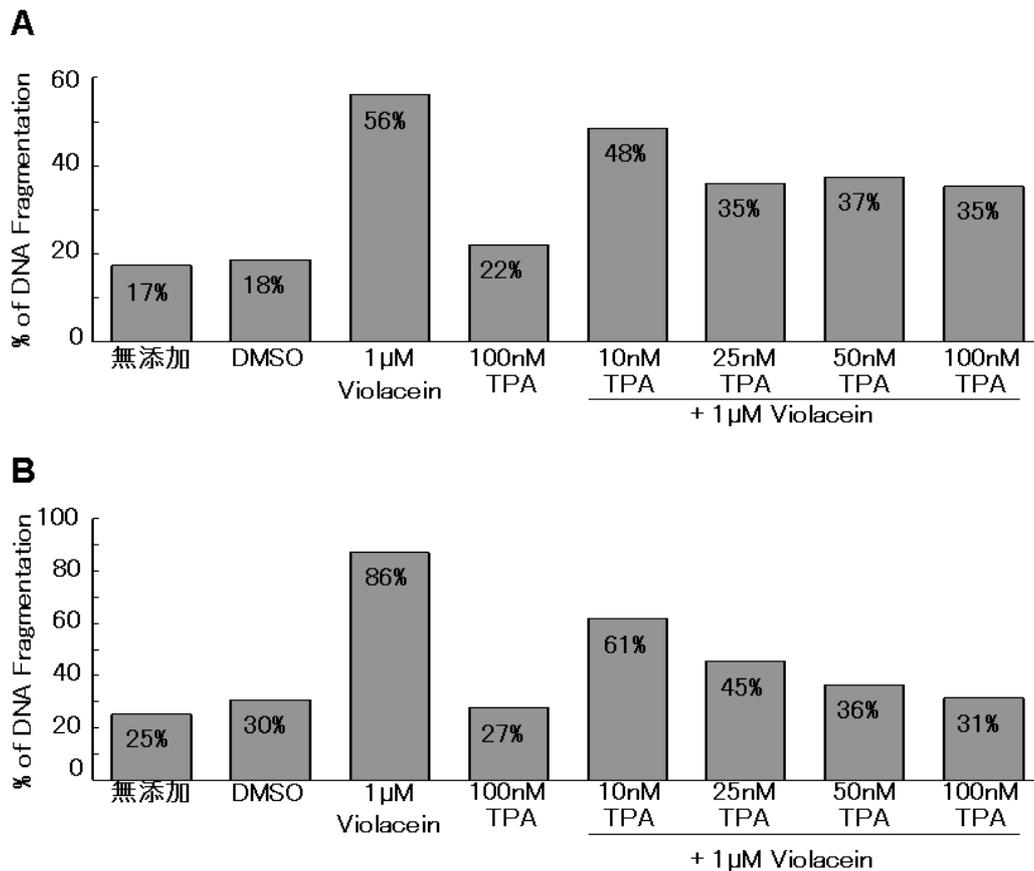


Fig. 15 ヴィオラセインによる DNA 断片化量の定量

U937 細胞 (A) 及び HL60 細胞 (B) を 1 μM ヴィオラセインと 10-100 nM TPA 存在下で 3 時間処理した。断片化 DNA と非断片化 DNA を抽出し、DAPI により DNA を染色した。各試料の断片化 DNA と非断片化 DNA の蛍光の合計を 100% DNA 量として、断片化 DNA の割合を計算した。

このように TPA による PKC 活性化が、ヴィオラセインによるアポトーシスを抑制することから、アポトーシスにおける PKC 代謝系の関与が示された。そこで、PKC に対するヴィオラセインの影響を放射性 [γ - 32 P]ATP による基質ペプチドのリン酸化によって直接評価した。精製 PKA 触媒サブユニット及び精製 PKC 触媒サブユニットを用いてその酵

素活性に対するヴィオラセインの効果を検証した。その結果、ヴィオラセインはプロテインキナーゼに対して濃度依存的に阻害作用を示し、PKA では $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ 、PKC では $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ であった (Fig. 16)。

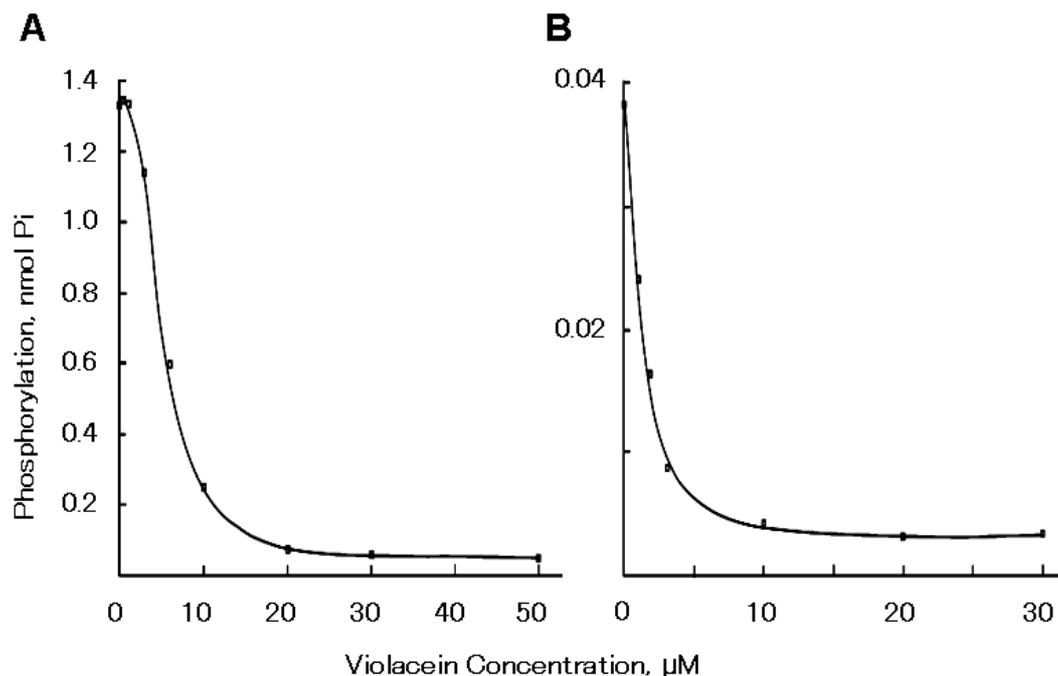


Fig. 16 ヴィオラセインによるプロテインキナーゼの活性阻害

PKA 触媒サブユニット (A) 及び PKC 触媒サブユニット (B) による基質ペプチドのリン酸化反応をヴィオラセイン存在下で行った。

このようにヴィオラセインは PKC のみならず、もう一つのセリン・スレオニンプロテインキナーゼである PKA に対しても阻害作用を示した。しかし、PKC の場合と比べて IC_{50} 値は大きく、PKA の阻害にはより高濃度のヴィオラセインが必要であった。これらの結果、及びヴィオ

ラセインによるアポトーシスが TPA による PKC 活性化によって抑制されることから、ヴィオラセインによる白血病細胞のアポトーシスには PKC が重要な役割をしていることを見出した。

総括

海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株産生 ヴィオラセインは、白血病細胞 HL60、U937 に対してアポトーシスによる細胞死を誘導する作用を示した。さらに、このアポトーシスは、ヴィオラセインが PKC に対して阻害的に作用することを端緒として引き起こされることが示唆された。

本研究では、ヴィオラセインは HL60、U937、K562 細胞に対して細胞毒性を示し、そのうち HL60、U937 細胞の細胞死はアポトーシスによることが確認できた。アポトーシスの誘導経路に関しては、ヴィオラインによる TNF レセプターの活性化を確認することはできなかった。

既存の報告では、ヴィオラセインは HL60 細胞にのみ細胞毒性を示し、U937 及び K562 細胞に対しては毒性がないとされている (Ferreira *et al.* 2004)。同時に、HL60 細胞に対するヴィオラセインの細胞毒性は、TNF レセプターの活性化から始まるアポトーシスによるものであると述べられている。この報告と本研究における結果との違いについては、実験に用いられた細胞株の薬剤やストレスに対する感受性の違いによるものだと考えられる。おそらく細胞の継代により感受性に変化が生じたことが考えられるが、明確な原因は不明である。

一方、本研究では、ヴィオラセインの新しい機能としてプロテインキナーゼに対する阻害作用を見出した。ヴィオラセインが腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導することは知られている。しかし、ヴィオラセインがどのようにしてアポトーシスを引き起こしているのか、その端緒となる機構は明らかとされていなかった。本研究では、白血病細胞におけるヴィオラセインによるアポトーシスが、プロテインキナーゼ C の活性化により抑制されることを示した。また、ヴィオラセインの PKC に対する阻害作用を、PKC の基質に対するリン酸化反応の阻害を見ることで直接に検証することができた。これらのことから、ヴィオラセインはプロテインキナーゼを阻害することにより、アポトーシスを誘導することが推測できる。また、プロテインキナーゼ阻害剤としてヴィオラセインを用いることが出来る可能性を見出した。

最近、米国の試薬メーカーより *Janthinobacterium lividum* が産生するヴィオラセインが発売された。このことはヴィオラセインが実際の応用研究に使用され始めたことを象徴しているが、本研究の結果は、ヴィオラセインがさらに広い応用研究に利用できることを示している。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導、御助力を賜りました高知工科大学 榎本恵一教授に深く感謝いたします。学位論文審査をしていただいた高知工科大学 松元信也教授、有賀修准教授、常磐大学 佐塚正樹准教授、JST イノベーションサテライト高知 細川隆弘館長に深く感謝いたします。細胞培養を行うにあたりご協力いただいた、常磐大学 佐塚正樹准教授に深く感謝いたします。PKC 阻害試験においてご協力いただいた Azamjon B. SOLIEV 氏、梶原亜紀氏に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたりご協力いただいた、堀澤栄准教授、巖嶋住予氏、四国理科（株）小笠原博氏、ならびに、環境生物工学研究室の卒業生および在籍する皆様に感謝し、ここに厚くお礼申し上げます。

参考文献

学术雜誌

Brazilian National Genome Project Consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11660-11665.

Balibar, C.J. and Walsh, C.T. (2006) In vitro biosynthesis of violacein from l-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry* **45**, 15444-15457.

Bromberg, N., Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Palladino, M.V., Durán, N., Nader, H.B., Haun, M., Justo, G.Z. (2010) Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem. Biol. Interact.* **186**, 43-52.

Cho, S.-G. and Choi E.-J. (2005) Apoptotic signaling pathways: Caspases and stress-activated protein kinases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 24-27.

de Carvalho, D.D., Costa, F.T., Duran, N., Haun, M. (2006) Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells.

Toxicol. In Vitro **20**, 1514-21.

Durdán, N. and Menck, C.F.M. (2001) *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**, 201-222.

Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L. and Martins, D. (2007) Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48**, 127-133.

Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Durán, N. and Peppelenbosch, M.P. (2004) Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**, 1459-1464.

Hirano, S., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y. and Nagano, S. (2008) Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *J. Biol. Chem.* **283**, 6459-6466.

King, M.A., Eddaoudi, A., Davies, D.C. (2007) A comparison of three flow cytometry methods for evaluating mitochondrial damage during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *Int. Soc. Anal. Cytol. Cytometry Part A.* **71A**, 668-674.

- Kodach, L.L., Bos, C.L., Durán, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V. and Hardwick, J.C.H. (2006) Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 506-516.
- Laatsch, H. and Thomson, R.H. (1984) Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1331-1339.
- Leon, L.L., Miranda, C.C., De Souza, A.O. and Duran, N. (2001) Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 449-450.
- Margalith, P.Z. (1992) Pigment Microbiology, pp 111-118. *London, Chapman & Hall.*
- Masuda, Y., Yoda, M., Ohizumi, H., Aiuchi, T., Watabe, M., Nakajo, S. and Nakaya, K. (1997) Activation of protein kinase C prevents induction of apoptosis by geranylgeraniol in human leukemia HL60 cells. *Int. J. Cancer* **71**, 691-697.

- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjellebergs, S., Jurgens, K., (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1593-1599.
- McCarthy, S.A., Sakata, T., Kakimoto, D. and Johnson, R.M. (1985) Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish* **51**, 479-484.
- Melo, P.S., Vidal, B., Haun, M. and Duran, N. (2000) Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* **36**, 539-543.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., Azevedo, M.B.M., Durán, N., Haun, M. (2003) Violacein and its β -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cell. *Toxicology* **186**, 217-225.
- Momen, A.Z.M.R. and Hoshino, T. (2000) Biosynthesis of violacein: intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 539-549.

- Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. and Schippa, S. (2007) Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 992-999.
- Richard, C. (1993) *Chromobacterium violaceum*, bactérie pathogène opportuniste des régions tropicales et subtropicales. *Bull. Soc. Path. Ex.* **86**, 167-173.
- Ryan, K.S., Balibar, C.J., Turo, K.E., Walsh, C.T. and Drennan, C.L. (2008) The violacein biosynthetic enzyme VioE shares a fold with lipoprotein transporter proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 6467-6475.
- Sánchez, C., Braña, A. F., Méndez, C. and Salas, J.A. (2006) Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *ChemBioChem* **7**, 1231-1240.
- Saraiva, V.S., Marshall, J.C., Cools-Lartigue, J., Burnier, M.N Jr. (2004) Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **14**, 421-424.
- Shinoda, K., Hasegawa, T., Sato, H., Shinozaki, N., Kuramoto, H., Takamiya, Y., Sato, T., Nikaidou, N., Watanabe, T. and Hoshino,

- T. (2007) Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function. *Chem. Commun.* 4140-4142.
- Thornberry, N.A. (1998) Caspase: key mediators of apoptosis. *Chem. Bio.* **5**, 97-103.
- Toomik, R. and Ek, P. (1997) A potent and highly selective peptide substrate for protein kinase C assay. *Biochem. J.* **322**, 455-460.
- Ullal, A.J., Pisetsky, D.S. (2010) The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis.* **15**, 586-596.
- Yada, S., Ohba, M. and Enomoto, K. (2003) Analysis of bacterial species in the Muroto deep seawater. *Deep Ocean Water Res.* **4**, 47-56. (in Japanese)
- Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R. and Enomoto, K. (2008) Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar. Biotechnol.* **10**, 128-132.

参考図書

田沼靖一編（2004）：わかる実験医学シリーズ アポトーシスがわかる
羊土社 ISBN4-89706-988-2

秋山徹編（2004）わかる実験医学シリーズ シグナル伝達ができる 羊
土社 ISBN4-89706-987-4

辻本賀英編（2006）バイオ研究マスターシリーズ 細胞死・アポトー
シス 集中マスター 羊土社 ISBN4-89706-940-8

山本雅編（2008）バイオ研究マスターシリーズ シグナル伝達 集中マ
スター 羊土社 ISBN978-4-89706-937-1

秋山徹・河府和義編（2006） 阻害剤活用ハンドブック 作用機序・
生理活性機能などの重要データがわかる 羊土社
ISBN4-7581-0806-4

辻本賀英、刀祢重信、山田武編（2004）実験医学別冊 バイオマニュ
アル UP シリーズ 新アポトーシス実験法 基本操作と最先端の解
析法 羊土社 ISBN4-89706-475-9

黒木登志男・許南浩編（2004）実験医学別冊 培養細胞実験ハンド
ブック 細胞培養の基本と解析法のすべて 羊土社
ISBN4-89706-884-3

関連学位論文

海洋細菌産生青紫色素“violacein”の抗腫瘍作用 高知工科大学 大学院 工学研究科 基盤工学専攻 細川覚司（平成 18 年度 修士論文）

Violacein による白血病細胞のアポトーシス 高知工科大学 物質・環境システム工学科 巖嶋住予（平成 18 年度 卒業論文）

業績

学術雑誌

Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R. and Enomoto, K. (2008) Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar. Biotechnol.* **10**, 128-132.

特許出願

プロテインキナーゼ阻害剤及びその製造方法、並びに癌治療用医薬品組成物及び試薬（特願 2008-301770 号）発明者： 榎本恵一、細川覚司

学会発表

第 78 回 日本生化学会大会（2005、神戸）

Kakushi Hosokawa, Shuichi Yada, Masaki Sazuka and Keiichi Enomoto, “Evaluation of the toxicity of Ocean Violet, a pigment from marine bacteria, to leukemia cells”

第 47 回 日本生化学会中国・四国支部例会（2006、松江）

細川覚司、王 又、矢田修一、佐塚正樹、榎本恵一 “海洋細菌が
産生する色素 violacein の白血病細胞に対する効果”

第 9 回マリンバイオテクノロジー学会大会（2006、東京）

王 又、細川覚司、矢田修一、榎本恵一 “海洋細菌
Pseudoalteromonas sp. が産生する抗腫瘍活性色素の化学構造解析
による同定”

第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会（2007、高知）

王 又、緒方巨樹、中島 彩、細川覚司、榎本恵一 “海洋細菌
Pseudoalteromonas sp. 1020R 株の 3 種類のプロデュージオン様色
素”

第 83 回 日本薬理学会年会（2010、大阪）

細川覚司、榎本恵一 “Violacein による白血病細胞 U937 のアポト
ーシス誘導機構”

付録

細胞培養培地

RPMI-1640 Medium, Liquid (Sigma, R8758) : 基本培地として使用した。

血清

Bovine Serum, Adult (Sigma, B9433) : 最終濃度 10% となるように培地に添加する。U937、K562 細胞に使用。非働化处理 (56°C、30 分間) し使用する。

Newborn Calf Serum (Sigma, N4762) : 最終濃度 10% 又は、20% となるように培地に添加する。HL60 細胞に使用。血清濃度 10% は通常培養、20% 濃度は -80 度より細胞を起こしたときに使用する。

37°C で解凍後、50ml 遠沈管に 10% 量を分注し、-20°C で保存する。

抗生物質

Amphotericin B solution (Sigma, A2942) : 濃度 250 µg/ml のアンホテリシン B を培地に最終濃度 2.5 µg/ml で添加する。

Gentamicin solution (Sigma, G1397) : 濃度 50 mg/ml のゲンタマイシンを培地に最終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ で添加する。

Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333) : 濃度 10,000 units/ml ペニシリン-10 mg/ml ストレプトマイシンを培地に最終濃度 50 U/ml-50 $\mu\text{g/ml}$ で添加する。

培養するとき抗生物質を必ず添加する必要性はなく、必要に応じて添加する。ここに示す最終濃度は、一般的な細胞培養に用いる濃度であり細胞に影響がないとされている。

白血病細胞

ヒト白血病細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。

ヒト急性骨髄性白血病細胞 HL60 (JCRB0085) : 倍加時間 30-40 時間

ヒト組織球性リンパ腫細胞 U937 (JCRB9021) : 倍加時間 約 19 時間

ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 (JCRB0019) : 倍加時間 約 20 時間

培養

RPMI-1640 培地に 10% 血清、必要に応じて抗生物質を添加し、培地を作成する。U937 細胞と K562 細胞では細胞数を約 20×10^4 個/ml にな

るように播種し継代培養する。HL60 細胞では細胞数 20×10^4 個/ml より少なくならないように、約 30×10^4 個/ml の細胞数となるように播種し継代培養する。HL60 細胞は細胞数が少なくなると増殖の立ち上がりが悪くなり、死滅する可能性がある。継代は、細胞数が約 100×10^4 個/ml となったときに行う。継代後、U937 細胞、K562 細胞は 2-3 日で細胞数が約 100×10^4 個/ml となる。HL60 細胞では 3-5 日を要する。細胞の培養環境は、 37°C 、 CO_2 濃度 5%、加湿環境下で行った。また、加湿水に防カビ剤として Sodium Dehydroacetate Monohydrate (Sigma) を 1 g/l で添加している

試薬

Trypan Blue solution : Sigma, T8154 (100 ml)

Hoechst 33342 : Sigma, B2261 (25 mg)

Protein A-Sepharose : Sigma, P3391 (250mg)

Anti-human sTNF RI Antibody : フナコシ, AB-225-PB (1 mg)

TRAF2 (N-19) : コスモバイオ, sc-887

TPA : Sigma, P1585 (1 mg)

DAPI : D8417 (1 mg)

Kit

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

Promega, G3580 (20ml, 1,000 assays) : MTS Assay

CaspGLOW™ Fluorescein Caspase Staining Kit

Bio Vision, K180-100 (100 assays) : Caspase 荧光染色

CaspACE™ Assay System, Colorimetric

Promega, G7220 (1 system, 100 reaction) : Caspase-3 活性

Human TNF- α ELISA Ready-SET-Go!

eBioscience, 88-7346-22 (96 well \times 2) : 可溶型 TNF- α 検出